昆虫海藻糖酶的基因特性及功能研究进展

唐　斌[1,2,*]，魏　苹[1]，陈　洁[2]，王世贵[1]，张文庆[2]
（1. 杭州师范大学生命与环境科学学院，杭州 310036；2. 中山大学生命科学学院，广州 510275）

摘要：海藻糖酶(Treh)是昆虫能量代谢必不可少的一类酶，亦是昆虫体内几丁质合成通路的第一个酶。其基因表达和酶活性直接与正常发育、蜕皮、变态以及繁殖等昆虫重要生理过程密切相关。目前已有多种昆虫的海藻糖酶基因被成功克隆，从而发现昆虫海藻糖酶基因家族由多个成员组成。海藻糖酶基因所编码的蛋白大多数具有一个信号肽前导区，部分蛋白拥有 1 ~ 2 个跨膜结构域，根据是否具有跨膜结构，可将其分为可溶性海藻糖酶(Treh1)和膜结合型海藻糖酶(Treh2)两类，膜结合型海藻糖酶具有 2 个特有的标签序列，即“PGGRFREFYYWDSY”和“QWDYPNAWPP”。海藻糖酶的主要功能是将胞外和胞内的海藻糖降解成葡萄糖，为昆虫的生命活动提供能量。具体表现为两个方面，一是参与昆虫几丁质合成途径，从而调控表皮、中肠等处的几丁质合成；二是通过与激素的协同作用，调控昆虫体内海藻糖和葡萄糖等糖类物质的浓度变化，从而有效保护体内细胞的适应并渡过相应的逆境环境，并提高其抗逆能力。鉴于海藻糖酶的重要功能，其已成为害虫控制的潜在新靶标。不同类型海藻糖酶的功能研究及酶抑制剂的研发与应用将进一步推动害虫生物防治的发展。

关键词：海藻糖酶；基因克隆；几丁质合成；能量代谢；海藻糖酶抑制剂
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)11-1315-07

Progress in gene features and functions of insect trehalases

TANG Bin[1,2,*], WEI Ping[1], CHEN Jie[2], WANG Shi-Gui[1], ZHANG Wen-Qing[2] (1. College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Trehalase (Treh) plays key roles in energy metabolism and is the first enzyme in chitin biosynthesis pathway of insect. Expression profile and enzyme activity of Treh are related to many important physiological processes of insects, including development, molting, metamorphosis and reproduction. To date, two kinds of *Treh* genes have been successfully cloned in different insect species, and it has been found that the gene family of insect *Trehs* is composed of multiple members. Most proteins encoded by *Treh* genes contain signal peptides in their leader regions, and partial proteins possess 1 or 2 transmembrane domains, based on which, Trehs are divided into two types, named the soluble (Treh1) and membrane-bound (Treh2) Trehs, respectively. In addition, there are two specific motifs (“PGGRFREFYYWDSY” and “QWDYPNAWPP”) in Treh2. The core function of Treh is to degrade the extra and intercellular trehalose into glucose in order to provide energy for insects, by participating in insect chitin biosynthesis to regulate chitin synthesis in the cuticle and midgut or cooperating with hormone to control the concentrations of trehalose and glucose dynamically in insects, so in this way insect cells would be effectively protected in adverse environment and their capacities of stress resistance be significantly improved. In view of the important roles it plays in energy metabolism and chitin biosynthesis, trehalase has been a potential novel target for insect pest control. The functional research of trehalase and development of its inhibitors may contribute to the biological control of insect pests in the future.

Key words: Trehalase; gene cloning; chitin synthesis; energy metabolism; trehalase inhibitors

海藻糖(trehalose)是昆虫血淋巴的重要糖类物质，由于其重要性被称为“血糖”(Wyatt, 1967；于

基金项目：国家自然科学基金项目(31071731, 31000880)；杭州师范大学优秀中青年教师支持计划(JTAS2011-01-031)；中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室访问学者基金资助项目(SKLBC12F01)
作者简介：唐斌，男，1980 年生，湖南永州人，博士，副研究员，研究方向为昆虫分子生物学和害虫生物防治，E-mail：tbzm611@163.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail：tbzm611@163.com
收稿日期 Received：2012-08-29；接受日期 Accepted：2012-11-16

彩虹等，2008），主要存在于幼虫、蛹和成虫阶段（Wyatt，1967；Elbein，1974；Friedman，1978；Becker *et al*.，1996；Elbein *et al*.，2003）。海藻糖主要通过海藻糖合成酶（trehalose-6-phosphate synthase，TPS）和海藻糖磷酸化酶（trehalose-6-phosphate phosphatase，TPP）基因在脂肪体内合成，再释放到血淋巴中，通过淋巴循环输送到各个组织并发挥功能（Thompson，2003；Tang *et al*.，2008，2010）。为了利用海藻糖，昆虫的许多组织拥有海藻糖酶，其能够催化 1 mol 的海藻糖降解为 2 mol 的葡萄糖（Wyatt，1967；Yaginuma *et al*.，1996）。通过基因克隆、蛋白纯化和酶活性测定结果发现昆虫确实存在两种不同类型海藻糖酶基因（*Trehalase*，简称 *Treh*）。根据是否存在跨膜结构或者潜在跨膜结构，昆虫的海藻糖酶基因分为两类，一种为可溶性海藻糖酶基因，通常称之为 *Treh*1（Takiguchi *et al*.，1992；Su *et al*.，1993，1994；Soto *et al*.，1997；Kamimura *et al*.，1999；Parkinson *et al*.，2003）；另一种为具有跨膜结构的膜结合型海藻糖酶基因，称为 *Treh*2（Mitsumasu *et al*.，2005，2008；Lee *et al*.，2007；Tang *et al*.，2008；Chen *et al*.，2010）。

可溶性海藻糖酶存在于细胞内，其主要的功能是分解细胞内的海藻糖；而膜结合型海藻糖酶为一跨膜蛋白，Treh2 主要是水解食物中的海藻糖，从而为肌肉运动和取食阶段中肠的运动提供能量（Mitsumasu *et al*.，2005；唐斌，2008）。海藻糖酶为昆虫能量代谢必不可少的一类酶，也是昆虫体内几丁质合成通路的第一个酶。海藻糖酶的表达被抑制后，能够调控害虫表皮和中肠的几丁质合成酶的表达，从而抑制几丁质的合成来杀死害虫（范柯琴等，2009；Chen *et al*.，2010；张倩等，2012）。因此，海藻糖酶已经成为害虫控制的重要靶标，具有实际农药意义的有效新型海藻糖酶抑制剂产品正在开发。

1　昆虫海藻糖酶基因的克隆及特性

1.1　昆虫海藻糖酶基因的克隆

1992 年，昆虫中第一个海藻糖酶基因在黄粉虫 *Tenebrio molitor* 中首先被报道（Takiguchi *et al*.，1992；Sato *et al*.，1997），随后家蚕 *Bombyx mori* 和腰带长茧蜂 *Pimpla hypochondriaca* 海藻糖酶基因也被克隆和研究（Su *et al*.，1993，1994；Parkinson *et al*.，2003）。分析发现这些均为可溶性的海藻糖酶基因，在幼虫的表皮、中肠、马氏管和卵巢以及蛹期的中肠中都有表达（Takiguchi *et al*.，1992；Su *et al*.，1993，1994；Kamimura *et al*.，1999；Parkinson *et al*.，2003）。免疫组化分析结果表明昆虫中存在两类海藻糖酶基因（Yaginuma and Happ，1989；Yaginuma *et al*.，1996），但是第二类海藻糖酶基因 *Treh*2 直到 2005 年在家蚕中经克隆后才被验证，随后相继在 2007 年西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和 2008 年甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 中被报道（Mitsumasu *et al*.，2005；Lee *et al*.，2007；Tang *et al*.，2008）。*BmTreh*2 结构特征和表达模式都不同于家蚕（Su *et al*.，1993，1994）和黄粉虫（Takiguchi *et al*.，1992；Sato *et al*.，1997）中的可溶性海藻糖酶基因，主要在幼虫的中肠中表达（Mitsumasu *et al*.，2005）。

目前，昆虫中包括黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、西方蜜蜂 *A. mellifera*（Lee *et al*.，2007）、甜菜夜蛾 *S. exigua*（Tang *et al*.，2008；Chen *et al*.，2010）、斜纹夜蛾 *S. litura*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等昆虫中都超过 2 个 *Treh* 基因被克隆，其分别属于这两类海藻糖基因（表 1）。随着基因组测序的发展，许多物种海藻糖酶基因被克隆，分析发现昆虫存在多个可溶性海藻糖酶基因（表 1），如在鞘翅目赤拟谷盗 *T. castaneum* 中克隆出 4 个可溶性海藻糖酶基因。

1.2　昆虫海藻糖酶基因的组织定位及编码蛋白的分子特性

海藻糖酶主要存在靠近血淋巴的细胞膜上或细胞内（Wyatt，1967；Valaitis and Bowers，1993；Yaginuma *et al*.，1996）。在家蚕 *B. mori* 和草地贪夜蛾 *S. frugiperda* 中，Treh1 主要位于柱状细胞内（Silva *et al*.，2009），而 Treh2 穿插并围绕在中肠的细胞膜上（Mitsumasu *et al*.，2005；Kamei *et al*.，2011）。可溶性海藻糖酶基因在中肠、马氏管和卵巢中表达，而膜结合型海藻糖酶基因则在脂肪体、中肠和马氏管中表达（张文庆等，2011）。

1.3　昆虫海藻糖酶基因及其编码蛋白的结构与性质

昆虫两类海藻糖酶的蛋白质序列相似度较低，大多数包括一个信号肽前导区，两者还各自具有一些独有的特点，如在甜菜夜蛾中 Treh2 在蛋白 C 端附近有一个长约 20 个氨基酸跨膜区域，Treh1 不存在跨膜区域（潘湛清，2011），埃及伊蚊 *A. aegypti*、西方蜜蜂 *A. mellifera* 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus*

表 1　主要几种昆虫海藻糖酶基因及其编码蛋白的特性

Table 1　Characteristics of some insect trehalase genes and their coding proteins

物种 Organism	基因名称 Gene name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	氨基酸数 Number of amino acids	分子量 MW (kD)	等电点 pI	TMH	信号肽位置 Signal peptide sites	糖基化位点数 Number of *N*-glycosylation sites	文献 References
埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	*AaTreh*2	XM_001660243	621	70.8	5.26	12 – 34; 598 – 620	1 – 30	4	
西方蜜蜂	*AmTreh*1	XM_393963	578	67.2	5.55		1 – 20	5	Lee *et al*., 2007;
Apis mellifera	*AmTreh*2	NM_001112671	626	72.8	5.36	13 – 32; 594 – 616	1 – 35	6	Mori *et al*., 2009
家蚕	*BmTreh*1	D86212	579	66.6	4.90		1 – 15	5	Su *et al*., 1993, 1994;
Bombyx mori	*BmTreh*2	NM_001043445	642	73.5	5.57	582 – 604	1 – 18	6	Mitsumasu *et al*., 2005, 2008; Kamei *et al*., 2011
黑腹果蝇	*DmTreh*1-1	DQ864058	596	67.7	4.87		1 – 23	2	
Drosophila melanogaster	*DmTreh*1-2	BT010119	1 042	115.5	5.83		1 – 21	2	
异色瓢虫	*HaTreh*1-1	HM056038	554	63.7	4.82		1 – 20	6	
Harmonia axyridis	*HaTreh*1-2	FJ501961	512	59.1	4.91		1 – 21	4	
	*HaTreh*1-3	JX514372	547	65.0	8.88		1 – 20	1	
灰飞虱	*LsTreh*1-1	JQ027050	602	69.8	5.77		1 – 25	4	张倩等, 2012
Laodelphax striatellus	*LsTreh*2	JQ027051	618	71.3	5.26	9 – 30; 597 – 617	1 – 26	6	
丽蝇蛹集金小蜂	*NvTreh*1	XM_003425471	620	71.6	5.74		1 – 27	5	
Nasonia vitripennis	*NvTreh*2	XM_001602129	671	77.3	6.22	600 – 622	1 – 27	5	
褐飞虱	*NlTreh*1	FJ790320	616	70.8	5.46		1 – 21	6	Gu *et al*., 2009
Nilaparvata lugens	*NlTreh*2	GQ397451	665	76.5	6.18	598 – 620	1 – 21	6	
竹蠹螟	*OfTreh*1	EF426724	581	66.8	5.17		1 – 16	5	Tatun *et al*., 2008a, 2008b
Omphisa fuscidentalis	*OfTreh*2	EF426723	648	74.0	5.86	581 – 603	1 – 15	6	
甜菜夜蛾	*SeTreh*1	EU427311	585	66.5	4.75		1 – 23	5	Chen *et al*., 2010
Spodoptera exigua	*SeTreh*2	EU106080	645	73.9	6.01	585 – 607	1 – 18	5	Tang *et al*., 2008
黄粉虫 *Tenebrio molitor*	*TmTreh*1	D11338	555	64.5	5.08		1 – 19	4	Takiguchi *et al*., 1992
赤拟谷盗	*TcTreh*1-1	XM_968798	541	63.7	4.82		1 – 18	5	
Tribolium castaneum	*TcTreh*1-2	XM_968883	563	66.1	8.81		1 – 18	2	
	*TcTreh*1-3	XM_968859	548	63.9	7.02		1 – 19	3	
	*TcTreh*1-4	XM_968826	553	63.7	4.86		1 – 16	6	
	*TcTreh*2	EFA11183	642	73.9	5.93	585 – 607	1 – 19	10	

TMH：跨膜区 Transmembrane helices. 采用 TMHMM Server v. 2.0 和 TMpred 进行在线分析预测。The TMHMM Server v 2.0 and TMpred softeware for on-line analysis.

的 Treh2 却同时拥有 2 个不同的跨膜区域（表 1）（张倩等，2012）。另外，海藻糖酶基因所编码的蛋白具有 2 个“标签结构”（signature motifs）：PGGRFREFYYWDSY 和 QWDYPNAWPP（Tang *et al*., 2008）。海藻糖酶的相对分子量一般在 40 ~ 120 kD，大部分昆虫的 Treh1 相对分子量在 65 kD 左

右，Treh2 相对分子量在 75 kD 左右。前期研究结果发现 Treh1 的 pI 为 4.5 左右，Treh2 的 pI 值为 6.5左右（Tatun *et al*., 2008b）。但是，在鞘翅目的异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 和赤拟谷盗中也发现了 pI 值高达 8 以上的可溶性海藻糖酶（表 1）。

2 海藻糖酶的活性调节

海藻糖酶活性受激素的调节（Tatun *et al*., 2008a；Gu *et al*., 2009；Yao *et al*., 2010），保幼激素能够提高美洲大蠊 *Periplaneta americana* 附腺海藻糖酶的活性（Ogiso and Takahashi, 1984），而 20E（20-羟基蜕皮甾酮）能够提高黄粉虫豆形附腺海藻糖酶的活性（Yaginuma and Happ, 1989）。注射 20E 或者 dsEcR（蜕皮激素受体）能够调节甜菜夜蛾 *SeTreh*1 的表达，而 *SeTreh*2 的表达未受影响（Yao *et al*., 2010）。在竹长蠹 *Omphisa fuscidentalis* 幼虫的中肠匀浆中，Treh1 活性占总海藻糖酶活性的大部分，并且激素 20E 可以提高 Treh1 的活性和加快其表达，而 Treh2 似乎保持稳定状态。还发现，在化蛹时期可溶性海藻糖酶的活性是由 *Treh*1 表达上调引起的（Tatun *et al*., 2008a）。海藻糖酶抑制剂 Trehazolin 注射到东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 后能够影响其活动能力并减少取食，注射后 10 d 内能够明显抑制海藻糖酶的活性（Liebl *et al*., 2010；Wegener *et al*., 2010）。

低温和短光周期可以诱导昆虫产生滞育，家蚕的 Treh2 的活性增强能够促进滞育激素诱导卵巢产生滞育卵（Kamei *et al*., 2011），有利于度过寒冷的季节。嗜眠摇蚊 *Polypedilum vanderplanki* 能够在干燥胁迫条件下通过提高 TPS 和 TPP 的活性，并同时降低 Treh 的活性，大量积聚海藻糖来保护昆虫应对这种胁迫环境（Mitsumasu *et al*., 2010），相类似的研究结果也在黑腹果蝇中得到验证（Thorat *et al*., 2012）。可溶性海藻糖酶 Treh1 活性在农药三唑磷（triazophos）处理褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 后大大提高，而膜结合型 Treh2 活性没有变化，并且长翅型 Treh1 的 mRNA 表达水平比短翅型明显要高，结果在农药胁迫和飞行过程中，Treh1 对海藻糖浓度的变化起主要的调控作用（Ge *et al*., 2011）。这些研究表明海藻糖酶能够通过调节昆虫体内海藻糖及其他糖类物质的浓度变化达到抗低温、干燥和农药等逆境胁迫的作用。

3 昆虫海藻糖酶功能研究

3.1 海藻糖酶对几丁质合成的调控

几丁质的合成和降解对昆虫的生长发育至关重要（Merzendorfer and Zimoch, 2003；Merzendorfer, 2006），由于几丁质合成产生故障而导致的昆虫生长发育紊乱这一点已在胚胎形成过程中观察到（Ostrowski *et al*., 2002；Chen *et al*., 2008；Tian *et al*., 2009）。最近的研究结果发现，海藻糖酶能够主要通过调控几丁质合成途径来控制昆虫的蜕皮过程（Chen *et al*., 2010；张倩等, 2012）。如 Chen 等（2010）和陈洁（2012）利用 RNAi 技术阐明了甜菜夜蛾的两类海藻糖酶基因在昆虫几丁质合成中的不同功能：可溶性 Treh1 主要影响几丁质合成酶 A 基因（*CHSA*）的表达，调控表皮中几丁质的合成表达；而膜结合型 Treh2 则影响几丁质合成酶 B 基因（*CHSB*）的表达，调控中肠中几丁质的表达，当 *Treh* 基因表达被抑制后，同时降低几丁质合成酶的表达，引起昆虫的发育受到阻碍，最终不能完成蜕皮而导致死亡。张倩等（2012）采用饲喂法研究两类海藻糖酶基因 dsRNA 对灰飞虱 *L. striatellus* 的致死效应，结果发现可溶性和膜结合型海藻糖酶基因的表达被抑制后，灰飞虱的生长受到抑制，体重减轻，死亡率分别达到 38.89% 和 27.72%。几丁质在合成时需要大量的葡萄糖，当海藻糖酶基因表达受到抑制后，血淋巴运送葡萄糖效率下降，影响昆虫生长发育。

3.2 海藻糖酶对昆虫能量代谢的调控

海藻糖和糖原为昆虫贮存能量的重要物质，在昆虫的能量代谢中具有重要的作用和功能。因此，海藻糖酶不仅在昆虫的几丁质合成途径中起着关键作用，而且参与昆虫的能量代谢途径（图 1），当海藻糖酶降解成葡萄糖受到影响后，昆虫体内的各种细胞供能和血糖浓度会受到影响，从而可能影响到其他的生化反馈途径（张倩等, 2012）。

海藻糖酶调控几丁质合成的研究很多，但是对于海藻糖是怎样通过控制血糖的平衡来调控昆虫的生长发育方面的研究较少。同样，通过 RNAi 抑制甜菜夜蛾 TPS 的表达后，60 h 内 65.14% 的甜菜夜蛾身体变软继而死亡（Tang *et al*., 2010）。以上结果表明海藻糖的合成和降解受到抑制后，能够影响几丁质合成和能量代谢等途径，从而调控昆虫的正常生长发育和变态等过程。

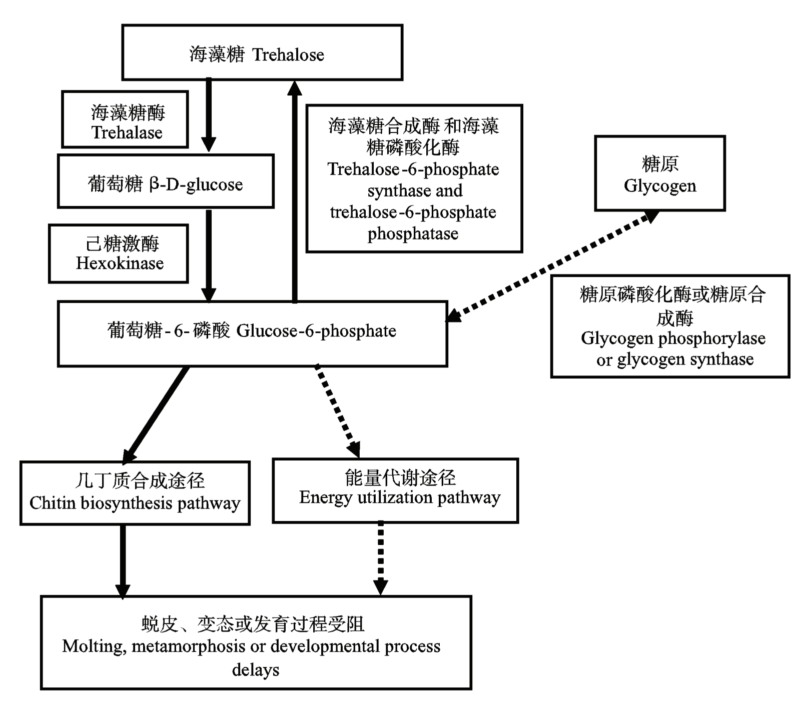


图 1　海藻糖酶基因调控昆虫几丁质合成及能量代谢途径(改自：Yao *et al*., 2010；Tang *et al*., 2012)

Fig. 1　The pathway of insect trehalase regulating chitin synthesis and energy metabolism (adapted from：Yao *et al*., 2010；Tang *et al*., 2012)

4　小结与展望

虽然前期已经对昆虫海藻糖酶的特性和功能进行了大量研究，明确可溶性海藻糖酶主要的功能是分解细胞内的海藻糖，而膜结合型海藻糖酶可以分解胞内和胞外的(主要为食物)海藻糖(Mitsumasu *et al*., 2005；唐斌，2008)。但是随着基因组测序的快速发展和昆虫分子生物学研究的进展，更多的昆虫海藻糖酶基因有望被发现，如在赤拟谷盗 *T. castaneum* 中克隆发现了 4 个可溶性海藻糖酶基因和 1 个膜结合型的海藻糖酶基因。许多其他昆虫种类中也发现了多个海藻糖酶基因，大多数昆虫包含多个可溶性海藻糖酶基因，那么这些不同的海藻糖酶基因在昆虫的生长发育过程中又到底存在哪些不一样的功能呢？因此，可溶性海藻糖酶在昆虫的生长发育中应该有功能的区分，它们之间是否在参与能量代谢和几丁质合成途径中有明确的分工，以及具体调控昆虫哪些部位的几丁质合成，这些都有待进一步研究。通过深入研究两类海藻糖酶的主要功能、可溶性海藻糖酶的功能差异及分工，相信更加有利于研究和开发出适合控制害虫的海藻糖酶抑制剂产品。

参考文献(References)

Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52：433－439.

Chen J, 2012. Preliminary Studies on Regulatory Mechanism of Chitin Biosynthesis Pathway in Insects. PhD Dissertation, Sun Yat-sen University, Guangzhou. [陈洁，2012. 昆虫几丁质合成通路调控机制的初步研究. 广州：中山大学博士学位论文]

Chen J, Tang B, Chen H, Yao Q, Huang X, Zhang D, Zhang W, 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE*, 5：e10133.

Chen XF, Tian HG, Zou LZ, Tang B, Hu J, Zhang WQ, 2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bull. Entomol. Res.*, 29：1－7.

Elbein AD, 1974. The metabolism of α, α-trehalose. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.*, 30：227－256.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D, 2003. New insights on trehalose：a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13：17－27.

Fan KQ, Jin LQ, Zheng YG, 2009. The enzymatic properties of trehalase and its exploitation as a target of new pesticides. *Chemistry & Bioengineering*, (4)：7－11. [范柯琴，金利群，郑裕国，2009. 海藻糖酶的酶学特性及其作为新农药靶标的开发应用. 化学与生物工程，(4)：7－11]

Friedman S, 1978. Trehalose regulation, one aspect of metabolic homeostasis. *Annu. Rev. Entomol.*, 23：389－407.

Ge LQ, Zhao KF, Huang LJ, Wu JC, 2011. The effects of triazophos on

the trehalose content, trehalase activity and their gene expression in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100(2): 172 - 182.

Gu JH, Shao Y, Zhang CW, Liu ZW, Zhang YJ, 2009. Characterization of putative soluble and membrane-bound trehalases in a hemipteran insect, *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 55: 997 - 1002.

Kamei Y, Hasegawa Y, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2011. Trehalase-2 protein contributes to trehalase activity enhanced by diapause hormone in developing ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 57(5): 608 - 613.

Kamimura M, Takahashi M, Tomita S, Fujiwara H, Kiuchi M, 1999. Expression of ecdysone receptor isoforms and trehalase in the anterior silk gland of *Bombyx mori* during an extra larval molt and precocious pupation induced by 20-hydroxyecdysone administration. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 41: 79 - 88.

Lee JH, Saito S, Mori H, Nishimoto M, Okuyama M, Kim D, Wongchawalit J, Kimura A, Chiba S, 2007. Molecular cloning of cDNA for trehalase from the European honeybee, *Apis mellifera* L., and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(9): 2656 - 2665.

Liebl M, Nelius V, Kamp G, Ando D, Wegener G, 2010. Fate and effects of the trehalase inhibitor trehazolin in the migratory locust (*Locusta migratoria*). *J. Insect Physiol.*, 56: 567 - 574.

Merzendorfer H, 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B*, 176: 1 - 15.

Merzendorfer H, Zimoch L, 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.*, 206: 4393 - 4412.

Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2005. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*: molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol. Biol.*, 14: 501 - 508.

Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2008. Changes in the expression of soluble and integral-membrane trehalases in the midgut during metamorphosis in *Bombyx mori*. *Zool. Sci.*, 25(7): 693 - 698.

Mitsumasu K, Kanamori Y, Fujita M, Iwata K, Tanaka D, Kikuta S, Watanabe M, Cornette R, Okuda T, Kikawada T, 2010. Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *FEBS J.*, 277: 4215 - 4228.

Mori H, Lee JH, Okuyama M, Nishimoto M, Ohguchi M, Kim D, Kimura A, Chiba S, 2009. Catalytic reaction mechanism based on alpha-secondary deuterium isotope effects in hydrolysis of trehalose by European honeybee trehalase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(11): 2466 - 2473.

Ogiso M, Takahashi SY, 1984. Trehalases from the male accessory glands of the American cockroach: developmental changes and the hormonal regulation of the enzymes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 55: 387 - 392.

Ostrowski S, Dierick HA, Bejsovec A, 2002. Genetic control of cuticle formation during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161: 171 - 182.

Pan ZQ, 2011. Heterologous Expression of *Spodoptera exigua* Trehalases and a Chitinase in Insect Cells. MSc Thesis, Sun Yat-sen University, Guangzhou. [潘湛清, 2011. 甜菜夜蛾海藻糖酶及几丁质酶在昆虫细胞中的表达. 广州: 中山大学硕士学位论文]

Parkinson NM, Conyers CM, Keen JN, MacNicoll AD, Smith I, Weaver RJ, 2003. cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 134: 513 - 520.

Sato K, Komoto M, Sato T, Enei H, Kobayashi MM, Yaginuma T, 1997. Baculovirus-mediated expression of a gene for trehalase of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, in insect cells, SF-9, and larvae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 1007 - 1016.

Silva MCP, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C, 2009. Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalase and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. *Insect Mol. Biol.*, 18(6): 769 - 784.

Su ZH, Ikeda M, Sato Y, Saito H, Imai K, Isobe M, Yamashita O, 1994. Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, *Bombyx mori* and its transcriptional activation by diapause hormone. *Biochim. Biophys. Acta*, 1218: 366 - 374.

Su ZH, Sato Y, Yamashita O, 1993. Purification, cDNA cloning and Northern blot analysis of trehalase of pupae midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1173: 217 - 224.

Takiguchi M, Niimi T, Su ZH, Yaginuma T, 1992. Trehalase from male accessory gland of an insect, *Tenebrio molitor*. cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. *Biochem. J.*, 288: 19 - 22.

Tang B, 2008. Studies on the Characteristic and Transcriptional Regulation of Important Genes in Chitin Biosynthesis Pathway of *Spodoptera exigua*. PhD Dissertation, Sun Yat-sen University, Guangzhou. [唐斌, 2008. 甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)几丁质合成通路中重要基因的特性与转录调控初步研究. 广州: 中山大学博士学位论文]

Tang B, Chen J, Yao Q, Pan ZQ, Xu WH, Wang SG, Zhang WQ, 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *J. Insect Physiol.*, 56(7): 813 - 821.

Tang B, Chen XF, Liu Y, Tian HG, Liu J, Hu J, Xu WH, Zhang WQ, 2008. Characterization and expression patterns of a membrane-bound trehalase from *Spodoptera exigua*. *BMC Mol. Biol.*, 9: 51 - 58.

Tang B, Xu Q, Zou Q, Fang Q, Wang SG, Ye GY, 2012. Sequencing and characterization of glycogen synthase and glycogen phosphorylase genes from *Spodoptera exigua* and analysis of their function in starvation and excessive sugar intake. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 80(1): 42 - 62.

Tatun N, Singtripop T, Sakurai S, 2008a. Dual control of midgut trehalase activity by 20-hydroxyecdysone and an inhibitory factor in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis* Hampson. *J. Insect Physiol.*, 54: 351 - 357.

Tatun N, Singtripop T, Tungjitwitayakul J, Sakurai S, 2008b. Regulation of soluble and membrane-bound trehalase activity and expression of the enzyme in the larval midgut of the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(8): 788 – 795.

Thompson SN, 2003. Trehalose – the insect 'blood' sugar. *Adv. Insect Physiol.*, 31: 203 – 285.

Thorat LJ, Gaikwad SM, Nath BB, 2012. Trehalose as an indicator of desiccation stress in *Drosophila melanogaster* larvae: a potential marker of anhydrobiosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 419: 638 – 642.

Tian HG, Peng H, Yao Q, Chen HX, Xie Q, Tang B, Zhang WQ, 2009. Developmental regulation of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE*, 4(7): e6225.

Valaitis AP, Bowers DF, 1993. Purification and properties of the soluble midgut trehalase from the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23(5): 599 – 606.

Wegener G, Macho C, Schlöder P, Kamp1 G, Ando O, 2010. Long-term effects of the trehalase inhibitor trehazolin on trehalase activity in locust flight muscle. *J. Exp. Biol.*, 213: 3852 – 3857.

Wyatt GR, 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.*, 4: 287 – 360.

Yaginuma T, Happ GM, 1989. 20-Hydroxyecdysone acts in the male pupa to commit accessory glands toward trehalase production in the adult mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 73: 173 – 185.

Yaginuma T, Mizuno T, Mizuno C, Ikeda M, Wada T, Hattori K, Yamashita O, Happ GM, 1996. Trehalase in the spermatophore from the bean-shaped accessory gland of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*: purification, kinetic properties and localization of the enzyme. *J. Comp. Physiol. B*, 166(1): 1 – 10.

Yao Q, Zhang DW, Tang B, Chen J, Chen J, Lu L, Zhang WQ, 2010. Identification of 20-hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PLoS ONE*, 5(11): e14058.

Yu CH, Lu D, Lin RH, Wang XJ, Jiang H, Zhao F, 2008. Trehalose – the blood sugar in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 832 – 837. [于彩虹, 卢丹, 林荣华, 王晓军, 姜辉, 赵飞, 2008. 海藻糖——昆虫的血糖. 昆虫知识, 45(5): 832 – 837]

Zhang Q, Lu DH, Pu J, Wu M, Han ZJ, 2012. Cloning and RNA interference effects of trehalase genes in *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(8): 911 – 920. [张倩, 鲁鼎浩, 蒲建, 吴敏, 韩召军, 2012. 灰飞虱海藻糖酶基因的克隆及 RNA 干扰效应. 昆虫学报, 55(8): 911 – 920]

Zhang WQ, Chen XF, Tang B, Tian HG, Chen J, Yao Q, 2011. Insect chitin biosynthesis and its regulation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 475 – 479. [张文庆, 陈晓菲, 唐斌, 田宏刚, 陈洁, 姚琼, 2011. 昆虫几丁质合成及其调控研究前沿. 应用昆虫学报, 48(2): 475 – 479]

(责任编辑：赵利辉)